

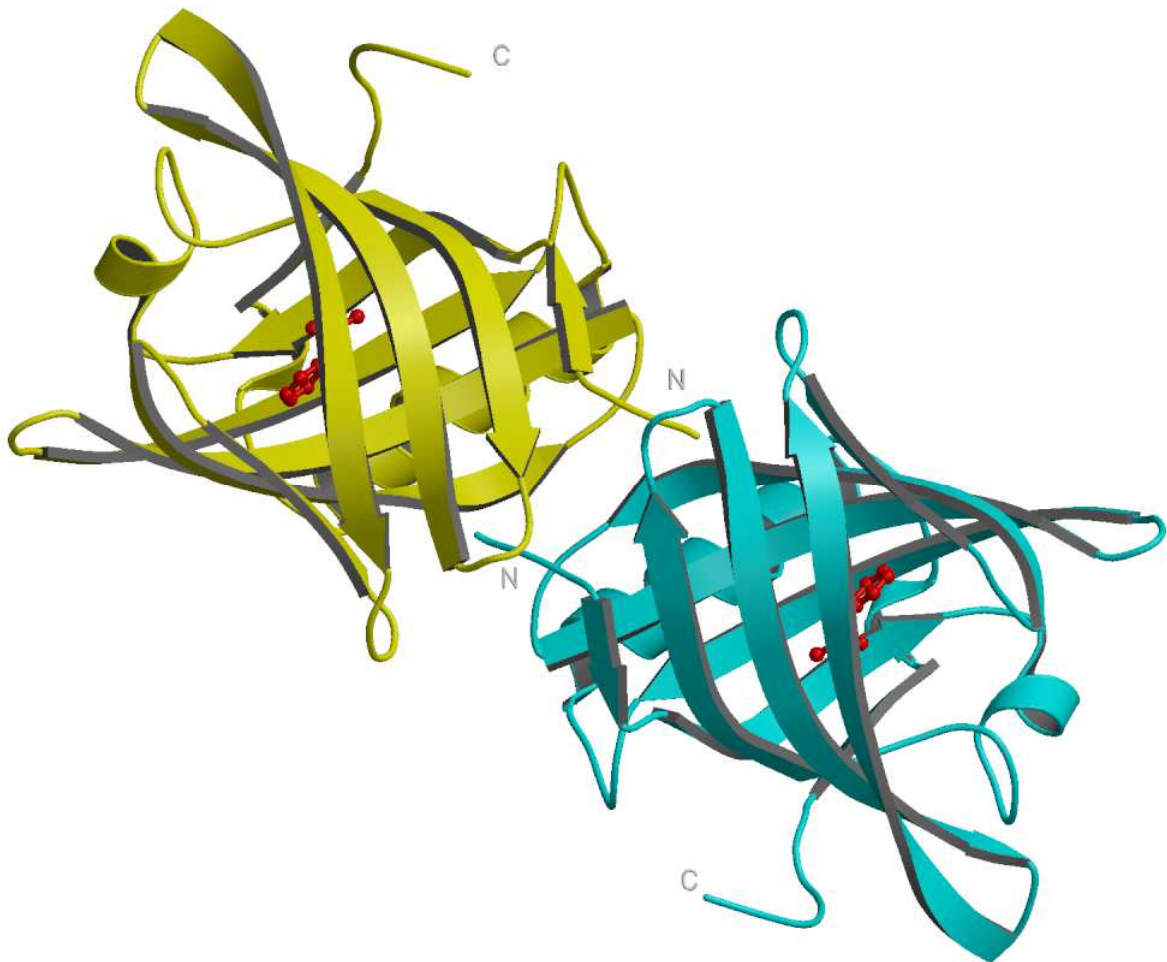


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA
DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE

Biologia Strutturale

2013

2014



MICROGRAVITY



LA CRISTALLIZZAZIONE DI MACROMOLECOLE

Step fondamentale per lo studio strutturale ai raggi X di una macromolecola consiste nell'ottenimento di una forma cristallina della molecola stessa. La caratteristica principale di un cristallo è la sua struttura tridimensionale interna, ordinata e periodica; è proprio questa a determinare la diffrazione dei raggi X e su questa si basa la cristallografia macromolecolare.

La cristallizzazione di molecole da una soluzione è un fenomeno di equilibrio reversibile e le caratteristiche termodinamiche e cinetiche di questo processo dipendono dalla natura di soluto e solvente. Quando un sistema formato da un soluto disciolto in un solvente è sovrassaturo, esso tende ad uno stato di equilibrio in cui il soluto è ripartito fra la fase in soluzione e quella solida. Poiché in un processo di cristallizzazione si passa da una situazione di maggior disordine ad una più ordinata, sembrerebbe che tale processo sia in contrasto con il secondo principio della termodinamica. Ciò che è fondamentale in queste condizioni è però l'energia libera, che deve arrivare ad un minimo durante la cristallizzazione. Le molecole, nonostante perdano la possibilità di compiere traslazioni e rotazioni, formano legami chimici stabili, ed è proprio l'intervento dell'energia di legame che rende la trasformazione energeticamente favorita. In sistemi molto semplici come sali inorganici o piccole molecole organiche in soluzione, i fattori che intervengono durante il processo di cristallizzazione sono ben conosciuti e relativamente facili da prendere in esame. Per quanto riguarda le macromolecole biologiche questi meccanismi sono molto più complicati e più difficilmente descrivibili.

La cristallizzazione spontanea di una molecola si verifica quando il processo è favorito termodinamicamente, cioè quando l'energia libera del sistema raggiunge un minimo. Una macromolecola biologica si trova ad un minimo di energia quando è completamente solvatata e tale condizione deve rimanere

inalterata anche nel cristallo. Un cristallo proteico quindi, a differenza di quelli inorganici od organici di specie a basso peso molecolare, è una struttura contenente un elevato numero di molecole d'acqua, il cui contenuto all'interno del cristallo può variare dal 30 all'80% in peso.

La difficoltà di cristallizzare le proteine consiste quindi nella realizzazione di condizioni chimico-fisiche tali che le macromolecole vengano estratte dalla fase soluzione pur rimanendo solvate e che quindi possano aggregarsi secondo un'organizzazione tridimensionale ordinata e non formando un precipitato di natura amorfa, realizzato dall'aggregazione disordinata. Questo dipende spesso dalla velocità con cui viene raggiunta la saturazione: più lento è il processo meglio le molecole riescono ad aggregarsi ordinatamente e regolarmente nello spazio. Un precipitato amorfo corrisponde al raggiungimento di un minimo relativo di energia libera. Se il minimo è abbastanza profondo la proteina rimane sotto forma di precipitato amorfo; viceversa ci sono dei casi in cui la barriera energetica è così piccola che si ha formazione di cristalli a partire dal precipitato amorfo.

La strategia che si usa per la cristallizzazione di una macromolecola è quella di portare il sistema molto lentamente verso un minimo di solubilità e in questo modo ottenere cristalli adatti all'analisi cristallografica, cioè che siano non solo cristalli singoli, ma di dimensioni almeno dell'ordine di 0.3-0.4 mm per ogni lato.

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRISTALLIZZAZIONE

La cristallizzazione di molecole biologiche dipende sia dal tipo di sostanza utilizzata come agente precipitante sia dalle condizioni chimico-fisiche nelle quali avviene l'esperimento.

a) Agenti precipitanti

L'acqua è un buon solvente per le proteine per due motivi diversi: stabilizza le cariche elettriche presenti sulla superficie esterna della proteina solvatandola e, avendo un'alta costante dielettrica, favorisce la separazione fra le cariche sfavorendo quindi l'aggregazione delle molecole fra loro. Possiamo dividere le sostanze che vengono utilizzate per favorire la cristallizzazione in tre gruppi:

1) Sali inorganici: diminuiscono la solubilità della macromolecola influenzando la forza ionica della soluzione.

Esistono teorie molto sofisticate che spiegano la maggior parte dei fenomeni che regolano il comportamento delle proteine in soluzione, ma è la teoria di Debye-Huckel valida per le sostanze inorganiche e anche per le piccole molecole organiche ad essere quella più semplice e comunque in grado di fornire delle indicazioni su come procedere per cristallizzare una proteina. Aumentando la concentrazione di un elettrolita nella soluzione acquosa in cui si vuole far cristallizzare la proteina, si forma intorno ad ogni specie carica (sia ionica che proteica) un'atmosfera di ioni di carica opposta. L'effetto di tale atmosfera ionica è diverso a seconda della concentrazione dell'elettrolita, dunque della forza ionica μ della soluzione, che è data dall'espressione:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_j z_j^2$$

dove c_j è la concentrazione dello ione j -mo nella soluzione e z_j la sua carica.

Quando la concentrazione dell'elettrolita è bassa, l'effetto dell'atmosfera ionica è quello di aumentare la solubilità della proteina, in quanto le interazioni con le molecole di acqua divengono più favorevoli (effetto di "salting in"). Quando la forza ionica supera un certo valore massimo si ha la competizione fra elettrolita e proteina per le molecole di acqua; dunque la proteina avrà meno solvente a disposizione e la sua solubilità tenderà a diminuire (effetto di "salting out"); in questo caso può avvenire la cristallizzazione.

Un fattore importante da considerare nella scelta del sale di precipitazione è la sua solubilità in acqua, che deve essere abbastanza elevata, in modo tale che esso non precipiti prima della cristallizzazione della proteina. L'efficienza di un particolare elettrolita è proporzionale alla forza ionica della sua soluzione e dunque alla sua carica; gli ioni bivalenti e trivalenti sono perciò preferiti. Anche la natura chimica del sale è però importante, nonostante i motivi non siano ancora chiari. Infatti quasi sempre capita che alla stessa forza ionica in cui la proteina con un determinato sale cristallizza, con un altro o rimane in soluzione o precipita in maniera amorfa. I sali inorganici maggiormente utilizzati nelle cristallizzazioni di proteine sono i seguenti:

- ◆ Solfati di sodio e di ammonio
- ◆ Succinato di ammonio
- ◆ Cloruro di litio
- ◆ Citrati di sodio o ammonio
- ◆ Fosfati di sodio o ammonio
- ◆ Cloruri di sodio, ammonio o potassio
- ◆ Acetati di sodio o ammonio
- ◆ Solfato di magnesio
- ◆ Cloruro di calcio
- ◆ Nitrato di ammonio
- ◆ Formiato di ammonio

2) Solventi organici: il loro effetto è duplice. Infatti un solvente organico interagisce con le molecole di acqua analogamente ai sali inorganici, ma soprattutto contribuisce ad abbassare la costante dielettrica del mezzo. Questo fa sì che la repulsione elettrostatica tra le molecole venga ridotta e la loro attrazione reciproca di conseguenza aumenti. I primi solventi organici ad essere usati a questo scopo sono stati l'Etanolo e l'Acetone ma, poiché sono molto volatili, ora si preferisce usare un alcool a peso molecolare maggiore, dunque meno volatile: il 2-metil-2,4-pentandiolo (MPD).

Purtroppo non sempre è possibile utilizzare solventi organici, perché in numerosi casi provocano la denaturazione delle proteine.

3) Polietilenglicoli (PEG): hanno formula chimica $(\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH}))_n$. Ce ne sono di vari pesi molecolari, i più usati sono quelli fra 2000 e 6000. Il meccanismo d'azione dei PEG non è ancora chiaro; probabilmente agiscono sia come i sali inorganici con un meccanismo di competizione con la proteina per le molecole d'acqua, sia con un meccanismo che si basa sull'esclusione di volume. Uno studio approfondito sulle interazioni tra la proteina e le molecole di PEG ha portato alla conclusione che si generano delle interazioni elettrostatiche sfavorevoli che potrebbero essere alla base di una separazione di fase della proteina dalla soluzione. I vantaggi riscontrati nel loro uso consistono nel fatto che la maggior parte delle proteine studiate cristallizzano spesso in un ristretto intervallo di concentrazione di PEG (5-15 %); inoltre il tempo necessario ad ottenere dei cristalli è breve rispetto a quello con gli altri agenti precipitanti.

b) Condizioni chimico-fisiche

1) Omogeneità della soluzione proteica: la precipitazione di molecole proteiche non è un processo utilizzabile per la purificazione, contrariamente a quanto avviene per la maggior parte dei composti organici. Di solito infatti la presenza di proteine contaminanti è il primo impedimento all'ottenimento di cristalli e la probabilità di ottenere cristalli singoli è legata alla purezza e all'omogeneità del campione; inoltre solo se il campione è omogeneo le condizioni di cristallizzazione sono riproducibili. Per questi motivi anche la formazione di prodotti di deamidazione o di frammenti proteolitici deve essere evitata.

Come controllo di purezza prima di cominciare le prove di cristallizzazione è consigliabile effettuare sia un gel di elettroforesi in SDS per verificare la presenza di altre molecole contaminanti (separazione in base al peso molecolare), sia un gel di focalizzazione isoelettrica per controllare le eventuali isoforme (separazione in base al punto isoelettrico), in quanto il carattere distintivo tra le varie isoforme è dato proprio da una leggera differenza nel punto isoelettrico.

2) Concentrazione della macromolecola: non esiste una concentrazione teorica ottimale per la cristallizzazione, anche se in genere si tende a mantenerla più alta possibile. La concentrazione ideale è quella alla quale la precipitazione non è né così veloce da portare ad un precipitato amorfo, né così limitata da dare piccolissime quantità di precipitato. In pratica l'intervallo in cui si opera è da 5 a 30 mg/ml di proteina di partenza.

3) pH: questo è uno dei fattori più importanti nella ricerca delle condizioni di cristallizzazione di una macromolecola. E' stato evidenziato che la differenza fra precipitato amorfo o microcristalli e cristalli singoli può essere data anche da una differenza di solamente 0.2 unità di pH. La ricerca del pH ottimale va fatta sia considerando il punto isoelettrico della proteina, in corrispondenza del quale la solubilità è minima, sia tenendo conto delle variazioni della solubilità in base alle variazioni degli altri parametri.

Occorre comunque considerare che valori troppo alti o troppo bassi di pH sono da evitare per non provocare la denaturazione della proteina.

4) Temperatura: influisce variamente sulla solubilità delle proteine; sono infatti state riportate cristallizzazioni che avvengono nell'intero intervallo tra 0°C e 40°C. In genere le cristallizzazioni sono condotte a temperatura costante, più frequentemente a 4°C o a temperatura ambiente (20°C).

5) Tempo: anche questa variabile purtroppo non è assolutamente prevedibile; infatti il tempo necessario ad avere la formazione dei cristalli può variare da poche ore a molte settimane e in alcuni casi anche mesi. In generale si cerca di tenere la velocità di nucleazione bassa per avere formazione lenta e dunque una maggior probabilità di ottenere pochi cristalli abbastanza grandi, piuttosto che molti ma troppo piccoli.

6) Ioni metallici: è stato osservato sperimentalmente che alcuni ioni metallici inducono o contribuiscono alla cristallizzazione di alcune macromolecole. In molti casi tali ioni influiscono sulla forza ionica, oppure aiutano a mantenere compatta la struttura cristallina. In altri casi gli ioni metallici bivalenti, come ad esempio Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , sono stati utilizzati per stimolare la crescita dei cristalli, anche se il meccanismo d'azione non è noto.

Quando ci sono proteine la cui cristallizzazione è invece inibita dalla presenza di ioni, occorre aggiungere degli agenti chelanti (EDTA).

7) Substrati e coenzimi: in molti casi l'aggiunta di un substrato particolare o di un coenzima per la macromolecola favorisce la cristallizzazione, poiché in questo modo la struttura è più rigida e dunque l'impaccamento è più semplice. A volte capita che la oloproteina cristallizzi in una forma molto diversa rispetto all'apoproteina a causa di vistosi cambiamenti conformazionali.

Dialysis

Macro dialysis and Concentration dialysis

Uso dei tubi da dialisi da 2mm di \varnothing e 100 μ l di proteina.

Microdialysis

Zeppenauer cells

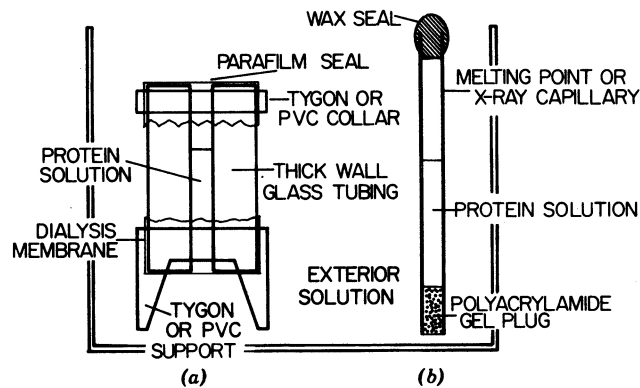


Figure 4.4. (a) The microdialysis cell proposed by Zeppenauer (549) for gradual equilibration of mother liquor with an exterior solution and (b) a version designed for smaller samples employing a polyacrylamide plug in place of the dialysis membrane.

Microcap dialysis

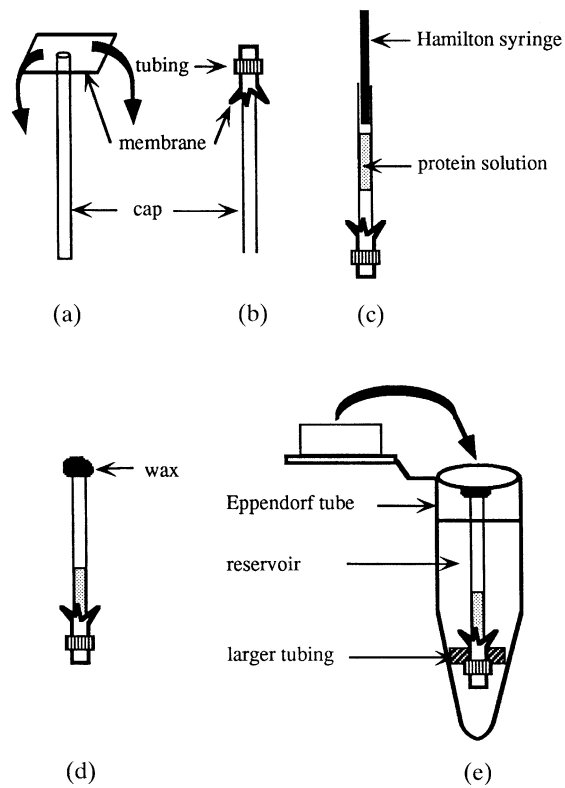


Figure 3. Crystallization by microcap dialysis. (a) Place the dialysis membrane on the microcap; (b) secure with Tygon ring; (c) load the protein; (d) close the extremity with wax; (e) fill up a 1.5 ml Eppendorf tube with crystallizing agent and insert microcap.

128

Dialysis buttons

Double dialysis

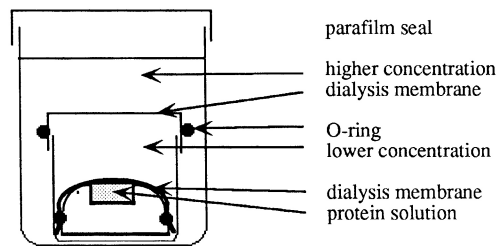


Figure 4. Double dialysis set-up (adapted from ref. 14). Macromolecule is contained in a conventional dialysis button placed in a second dialysis set-up. The equilibration rate depends upon the volumes of buffers in the different compartments.

Sequential Extraction

Precipitare la proteina con sali.

Centrifugare e recuperare il pellet.

Si risospende il pellet in una serie di soluzioni a concentrazione di sale decrescente a 4°C, si centrifuga e si tiene il surnatante a 4°C fino a che tutto il pellet si è sciolto.

Si portano i capillari contenenti le soluzioni a 20°C e i cristalli si formeranno nella soluzione in cui vi è la concentrazione di sali giusta a quella concentrazione.

Vapour diffusion

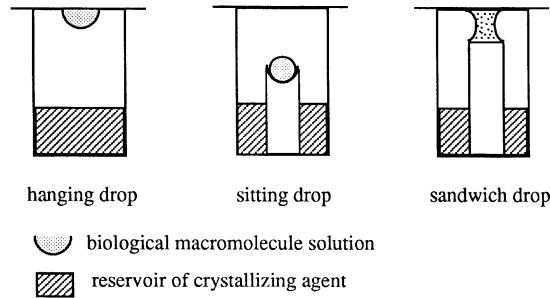


Figure 5. Schematic representation of hanging drop, sitting drop, and sandwich drop.

Hanging drop

Sitting drop

Sandwich box

Velocità diversa nel raggiungimento dell'equilibrio

Liquid bridge

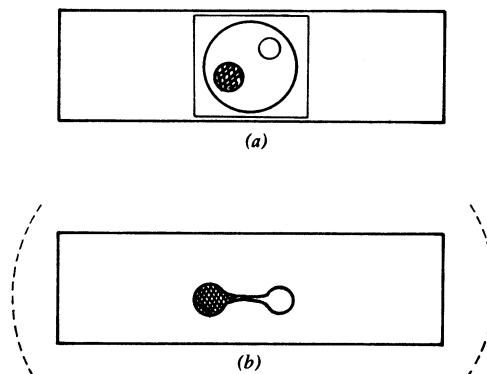


Figure 4.10. (a) Vapor equilibration of a microdroplet of mother liquor with a slightly larger droplet of precipitant conducted within the sealed well of a depression microscope slide and (b) the bridged droplet method performed on a microscope slide sealed inside a Petri dish.

ACA CrystalPlates

American Crystallographic Association (Cristal or Q Plate)

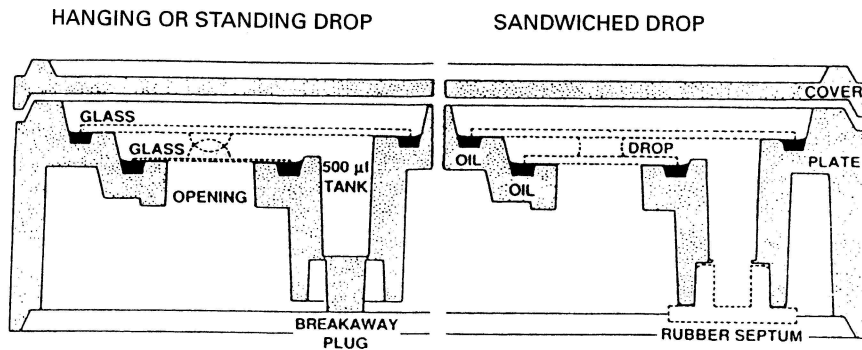


Figure 8. ACA CrystalPlate® (courtesy of ICN Flow). This is a versatile system for vapour diffusion crystallization allowing individual experiments on sitting, hanging, or sandwiched drops under classical or automated conditions.

Batch methods (Under oil)

Classical batch method

Una piccola goccia di proteina e precipitante è inserita sotto un sottile strato di olio (paraffina o silicone)

Interface diffusion

Liquid/liquid

In capillare, cristallizzante più denso sotto e proteina sopra.

Microgravity

Hipergravity

In centrifuga, successi nel 1936 per il virus del tabacco.

Separazione spaziale degli oligomeri e di proteine aventi pesi molecolari differenti.

Crystallization in gels (Silica and Agarose)

Il trasferimento di masse avviene solo per diffusione. I cristalli non sedimentano.

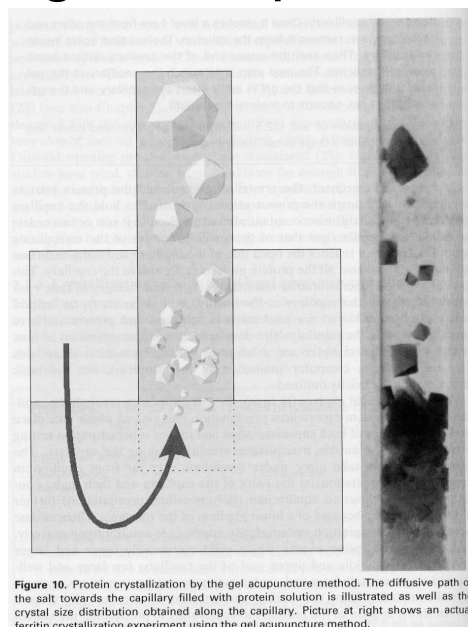
Inside the gel: Batch

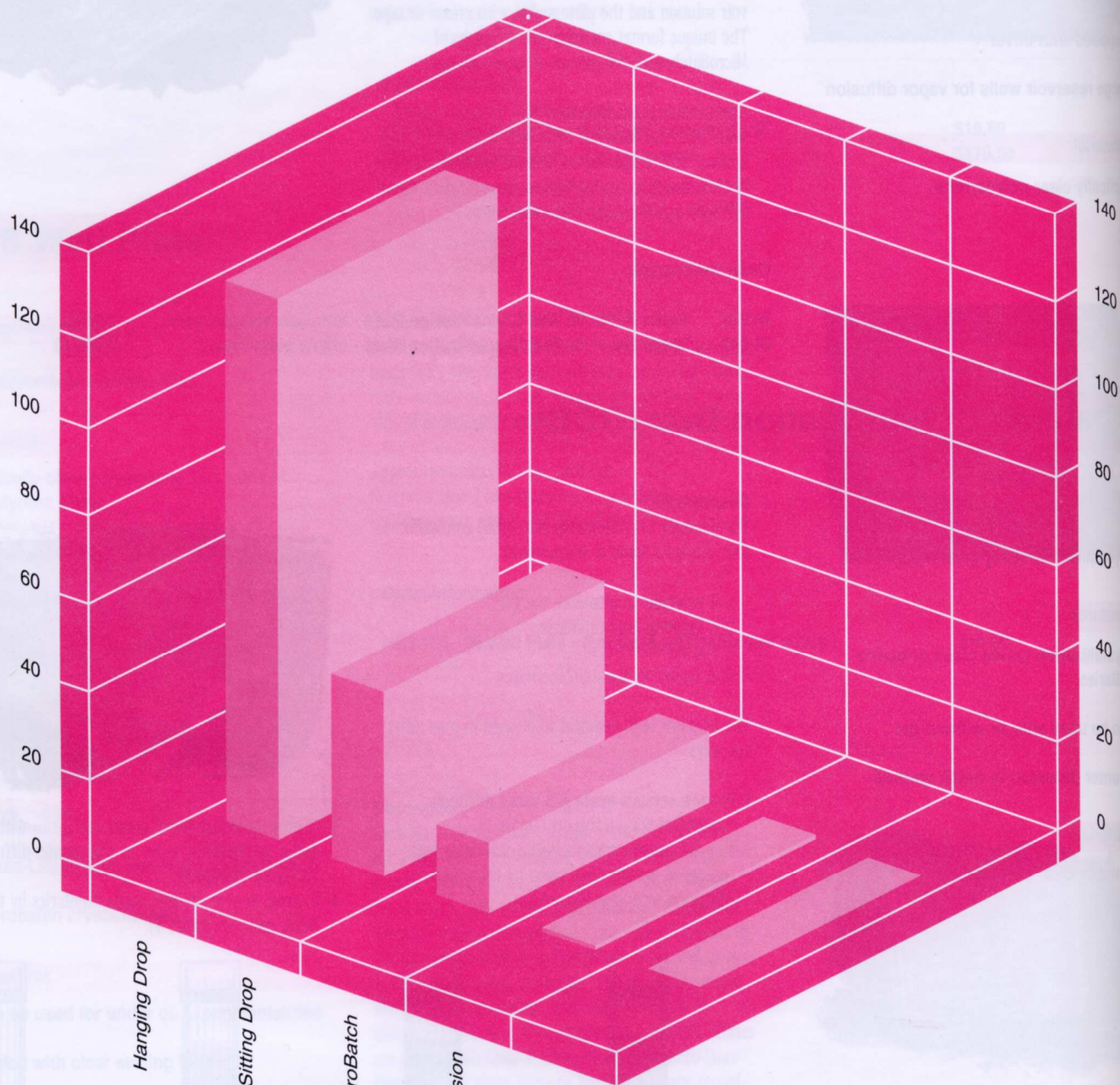
Differente preparazione tra silica e agarose.

Counter-diffusion

Le soluzioni sono messe in contatto direttamente o tramite membrana.

Outside the gel: Acupuncture method





Hanging Drop Crystallization: 123

Sitting Drop Crystallization: 42

MicroBatch Crystallization: 16

Liquid-Liquid Diffusion Crystallization: 1

MicroDialysis Crystallization: 0

The following is a survey taken by the crystallographic community at the Hampton Research website concerning the following question: Which of the crystallization methods do you use the most? The results are as follows (as of 8/30/02).

METODI PER OTTENERE LA SOVRASATURAZIONE

Avere una soluzione sovrasatura della proteina che interessa è fondamentale per poter ottenere dei cristalli. Ci sono vari metodi per ottenere la sovrasaturazione ma sono due quelli più utilizzati: l'uso della tecnica di microdialisi e di quella della diffusione di vapore, che hanno anche il vantaggio di permettere l'utilizzo di microquantità di soluzione, cosa molto importante quando si lavora con molecole biologiche.

1) Tecnica di microdialisi

La dialisi è un metodo utilizzato per la prima volta da Theorell (1932) nella cristallizzazione dell'emoglobina e successivamente sviluppato soprattutto da Zeppenzauer.

Consiste nel porre campioni della soluzione di macromolecole in recipienti appositi che vengono poi chiusi tramite una membrana semipermeabile, in grado cioè di lasciar passare solo molecole a basso peso molecolare, in questo caso quelle non proteiche. Questi recipienti erano inizialmente dei piccoli capillari o delle provette di vetro, ma negli ultimi anni si è affermato l'uso dei cosiddetti "bottoncini" di dialisi (*fig. 1*): questi sono delle celle di dialisi in plexiglas, provviste di una cavità tarata di volume compreso fra i 10 e i 100 μ l e di un fondo trasparente che permette l'esame al microscopio. Una scanalatura apposita facilita la chiusura del bottoncino con un anello di gomma che tiene ferma la membrana. Il bottoncino chiuso è poi posto all'interno di una fialetta, di solito avente volume di 20 ml, contenente la soluzione precipitante. Questa viene fatta variare lentamente (ad es. si aumenta la concentrazione di precipitante mediante aggiunte successive), osservando l'eventuale formazione di cristalli prima di ogni

aggiunta e fermandosi nel momento in cui appaiono i primi germi cristallini. In questo modo si instaura un equilibrio attraverso la membrana di dialisi fra la soluzione esterna e quella interna in cui si trova la macromolecola: la soluzione proteica diventa sovrasatura e, se le condizioni sono favorevoli, si ha la cristallizzazione.

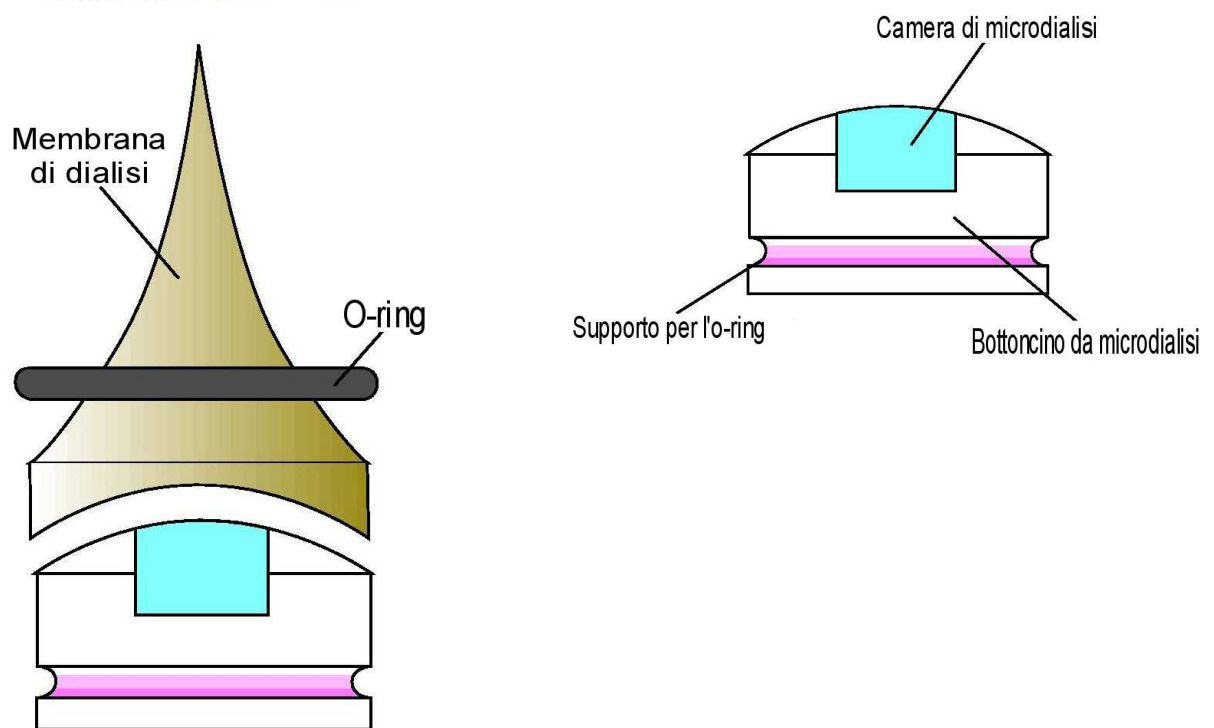


Fig 1 Microdialisi

2) La diffusione di vapore

Questo metodo sfrutta l'equilibrio di vapore che si viene a creare fra due soluzioni della stessa sostanza a concentrazioni diverse. Ci sono due diversi modi di procedere: utilizzando il metodo della "sitting drop" (goccia appoggiata) o quello della "hanging drop" (goccia pendente).

Il metodo della sitting drop (*fig.2*) consiste nel porre una goccia di 10-40 μl di una soluzione contenente la macromolecola da fare cristallizzare e il precipitante all'interno di un microbridge tramite una micropipetta. Tali gocce vengono poi sigillate all'interno di contenitori trasparenti che contengono già una certa quantità, variabile fra 0,5 e 3 ml, di una soluzione di precipitante (reservoir) ad una concentrazione maggiore da quella delle gocce. Attraverso la fase vapore la concentrazione del precipitante nelle gocce si equilibra con quella del reservoir e se viene raggiunta la condizione di sovrasaturazione si possono ottenere i cristalli.

Quando viene utilizzata la precipitazione con PEG o con sali inorganici, le gocce di soluzione devono contenere una concentrazione di precipitante minore (solitamente la metà) rispetto a quella della soluzione che viene aggiunta. Se invece si utilizzano solventi volatili come ad esempio l'Etanolo o l'Acetone, non c'è bisogno di aggiungerne all'interno della goccia. Nel primo caso la precipitazione avviene con lo spostamento dell'acqua dalla goccia al reservoir, nel secondo caso invece si ha uno spostamento di acqua dalla goccia al recipiente e di agente precipitante in senso opposto.

Questo metodo ha il vantaggio di richiedere solo piccole quantità di campione ed è inoltre l'ideale per provare diverse condizioni di cristallizzazione su più campioni contemporaneamente.

Per quest'ultimo scopo viene soprattutto utilizzata la tecnica dell'hanging drop (*fig.3*). Una microgoccia di soluzione della macromolecola (massimo 5 μl) viene posta su un vetrino coprioggetti da microscopio che viene successivamente sospeso su un pozzetto contenente 1 ml della

soluzione precipitante. E' importante che il vetrino venga sigillato al pozzetto con del silicone, in modo da impedire l'evaporazione del solvente dalle gocce o l'entrata di umidità dall'esterno. Questo tipo di esperimenti è facilitato dall'uso di piattini particolari; sono piastre per colture di cellule (Linbro plates), formati da 24 pozzetti cilindrici (1.7 cm di diametro e 1.6 cm di altezza) che possono con facilità essere chiusi con i vetrini e siliconati. Sono costruiti in plexiglas e questo permette il controllo dell'esperimento con il microscopio.

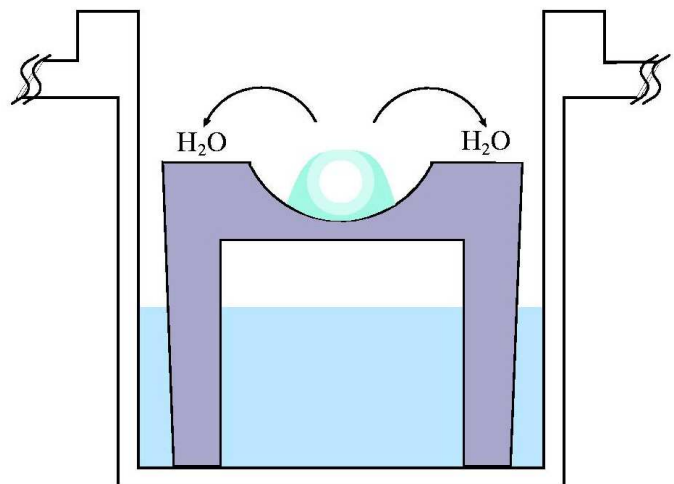


Fig 2 Sitting drop

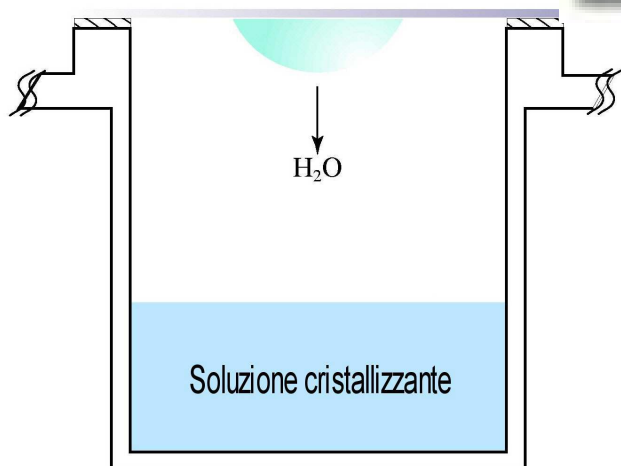
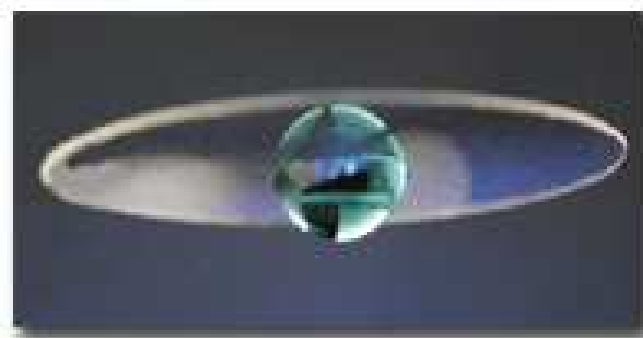


Fig 3 Hanging drop

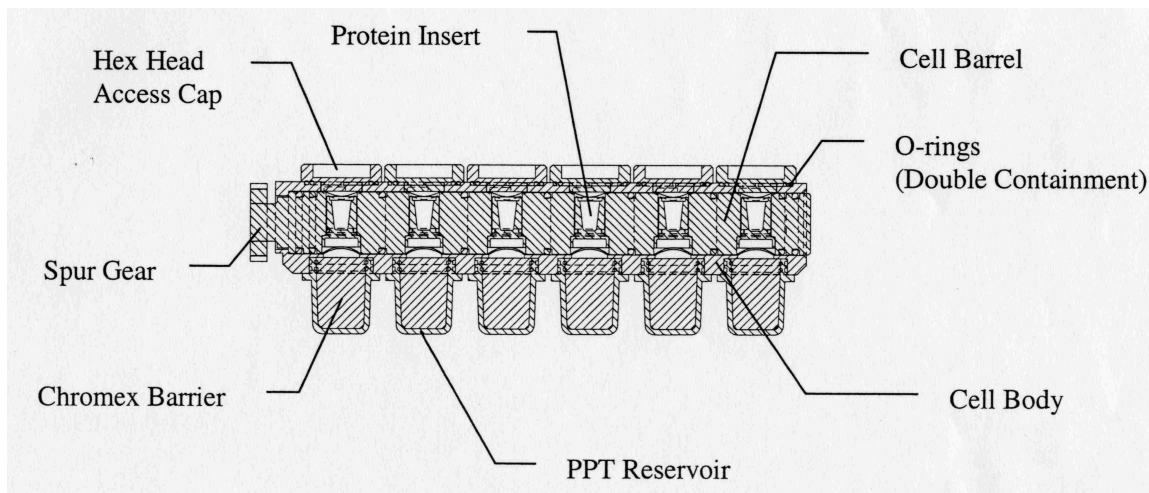


Fig 4 Microgravità